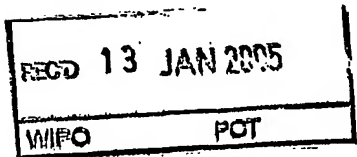


日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.11.2004



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 1 月 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 7 7 0 0 6
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 7 0 0 6]

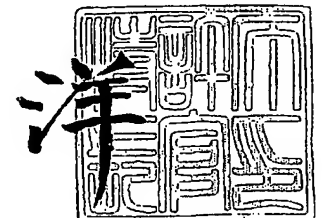
出 願 人
Applicant(s): 萬有製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 0334
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 古閑 一実
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 尾崎 諭司
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 市川 大介
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 南部 宏英
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 東 朋子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 酒井 直子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 河越 寛子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
 内
 【氏名】 太田 尚
【特許出願人】
 【識別番号】 000005072
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番3号
 【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社
 【代表者】 長坂 健二郎
 【電話番号】 03(3270)3222
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 013077
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 1 に記載の塩基配列を含む単離された核酸。

【請求項 2】

配列番号 1 に記載の塩基配列からなる単離された核酸。

【請求項 3】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 4】

配列番号 1 に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸からなるサル O R L 1 遺伝子。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 4 に記載の遺伝子を含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む単離されたタンパク質。

【請求項 8】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる単離されたタンパク質。

【請求項 9】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 又は 2 以上のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入があるアミノ酸配列を含む単離されたタンパク質。

【請求項 10】

サル O R L 1 遺伝子を導入し、サル O R L 1 を発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該 O R L 1 に対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。

【請求項 11】

サル O R L 1 遺伝子を導入し、サル O R L 1 を発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、
該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。

【請求項 12】

被検化合物を、サル O R L 1 に接触させる工程と、
該接触による該 O R L 1 の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。

【請求項 13】

前記サルがアカゲザルであることを特徴とする、請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の化合物の評価方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】サルORL1 (opioid receptor-like 1) 遺伝子及び化合物の評価方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規サルORL1遺伝子、タンパク質、当該遺伝子を含む発現ベクター、当該発現ベクターを含む宿主細胞及び当該遺伝子又はタンパク質を用いた化合物の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ノシセプチン (オルファニンFQと同一物質) は、オピオイドペプチドと類似の構造を持つ17アミノ酸よりなるペプチドである。ノシセプチンは、侵害刺激に対する反応性の増強活性、食欲増進活性、空間学習能力を低下させる活性、古典的オピエイト作動薬の鎮痛作用に対する拮抗作用、ドーパミン放出抑制作用、利尿作用、血管拡張作用、全身血圧降下作用などを有しており、脳内でノシセプチン受容体であるORL1を介して痛みや食欲の調節又は記憶・学習等に関与していると考えられている (ネイチャー (Nature)、1995年、377巻、532頁; ソサイエティー・フォー・ニューロサイエンス (Society for Neuroscience)、1996年、22巻、455頁; ニュウロレポート (NeuroReport)、1997年、8巻、423頁; ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス (Eur. J. Neuroscience)、1997年、9巻、194頁; ニュウロサイエンス (Neuroscience)、1996年、75巻、1頁及び333頁; ライフ・サイエンス (Life Sciences)、1997年、60巻、PL15頁及びPL141頁)。

【0003】

また、ORL1の発現が阻止されたノックアウト・マウスにおいては、モルヒネ耐性が減弱されること又は記憶・学習能力が向上することが知られている (ニュウロサイエンス・レターズ (Neuroscience Letters)、1997年、237巻、136頁; ネイチャー (Nature)、1998年、394巻、577頁)。

【0004】

したがって、ORL1へのノシセプチンの結合を特異的に阻害する物質は、癌性疼痛、術後疼痛、偏頭痛、痛風、慢性リウマチ、慢性疼痛、神経痛等の痛みを伴う疾患に対する鎮痛薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬耐性克服薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬依存性克服薬、鎮痛作用増強薬、抗肥満薬、脳機能改善薬、アルツハイマー病治療薬、抗痴呆薬、精神分裂症治療薬、パーキンソン病及び舞蹈病に代表される退行性神経変性疾患治療薬、抗うつ薬、尿崩症治療薬、多尿症治療薬又は低血圧治療薬として有用であることが期待できる。

【0005】

ところで、ヒトORL1は、オピオイド受容体のクローニングの過程でオピオイド受容体遺伝子と高い相同性を有するオーファン受容体としてクローニングされた (フェブス・レターズ (FEBS Letters)、1994年、341巻、33頁; 非特許文献1)。この受容体は、従来のオピオイドリガンドとの結合は認められず、その機能が不明であったが、その後、ORL1受容体のcDNA発現細胞に脳ペプチド画分を反応させてcAMPを減少させる活性を有するリガンドを同定した結果、内因性リガンドとしてノシセプチン又はオルファニンFQが単離された (ネイチャー (Nature)、1995年、377巻、532頁; 非特許文献2、サイエンス (Science)、1995、270巻、792頁; 非特許文献3)。

【0006】

一方、治療薬や診断薬の開発において、候補化合物は、げっ歯類及び霊長類においてその生理学的作用が評価される。これは、候補化合物が動物種によって異なる薬効を示すことがあるためであり、よりヒトに近い霊長類において評価することが効率的な治療薬や診

断薬の開発に結びつく。

【0007】

【非特許文献1】フェブス・レターズ (F E B S L e t t e r s)、1994年、341巻、33頁

【0008】

【非特許文献2】ネイチャー (N a t u r e)、1995年、377巻、532頁

【非特許文献3】サイエンス (S c i e n c e)、1995、270巻、792頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子は未だ単離されておらず、ヒト以外の霊長類の遺伝子を用いた治療薬や診断薬の評価は不可能な状況であった。

【0010】

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子及びタンパク質を提供することを目的とする。また、当該遺伝子又はタンパク質を用いた化合物の評価方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、アカゲザルORL1遺伝子を単離することに成功するとともに、当該受容体を用いた結合実験によりリガンドの評価を行うことに成功し、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明の核酸は、配列番号1に記載の塩基配列を含むことを特徴とする。また、本発明の核酸は、配列番号1に記載の塩基配列からなることを特徴とする。

【0013】

さらに、本発明の核酸は、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

【0014】

また、本発明の遺伝子は、配列番号1に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸からなるサルORL1遺伝子であることを特徴とする。

【0015】

さらに、本発明の発現ベクターは、前述の核酸又は遺伝子を含むことを特徴とする。また、本発明の宿主細胞は、前記発現ベクターを含むことを特徴とする。また、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0016】

さらに、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする。

【0017】

また、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入があるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。このような核酸、遺伝子、タンパク質、発現ベクター又は宿主細胞を利用することにより、霊長類ORL1又はその変異体の発現系の構築が可能となるとともに、当該発現系を用いた化合物の評価系の構築が可能となる。

【0018】

また、本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、サルORL1を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該受容体に対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

【0019】

さらに、本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、サルORL1を発現する細胞を調製する工程と、該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の当該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。

【0020】

さらに、本発明の化合物の評価方法は、被検化合物を、サルORL1に接触させる工程と、接触による前記ORL1の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

【0021】

このような化合物の評価方法によれば、霊長類ORL1を使用した治療薬・診断薬の候補化合物の評価やスクリーニングが可能となり、よりヒトに近いモデルシステムによって効率的な薬剤の開発が可能となる。

【発明の効果】

【0022】

本発明の核酸、タンパク質及び化合物の評価方法によれば、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子及びタンパク質を得ることが可能となるとともに、当該遺伝子又はタンパク質を用いて化合物の評価、スクリーニングを行うことが可能となる。従って、当該遺伝子又はタンパク質を用いた治療薬や診断薬の評価、開発が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0024】

本発明における「核酸」とは、例えば、DNA、RNA若しくは修飾されたDNA又はRNAをいい、好ましくはDNAをいう。また、前記DNAとしては、ゲノムDNAであるとcDNAであるとを問わず、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。

【0025】

また、本発明における「単離された」とは、組換えDNA技術により作成された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体物質又はその他の物質を実質的に含まない、核酸又はタンパク質をいう。

【0026】

また、本発明における「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、二つの核酸断片が、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9.47-9.62及び11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。より具体的には、例えば、約45℃にて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃にて2.0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジェンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2×SSC、50℃まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。

【0027】

次に、本発明に係るアカゲザルORL1について説明する。

【0028】

本発明に係るアカゲザルORL1遺伝子は、1113塩基のオープンリーディングフレーム(配列番号1)を有し、370アミノ酸のタンパク質(配列番号2)をコードする。

【0029】

アカゲザルORL1遺伝子のクローニング方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、アカゲザルORL1遺伝子又は当該遺伝子に相同性の高い遺伝子由来の核酸断片をもとに5'-RACE又は3'-RACEで全長cDNAを増幅する方法、適切なベ

クター（プラスミドベクター、バクテリオファージ等）を用いて構築された cDNA ライブラリーをアカゲザル ORL1 遺伝子の核酸断片を用いてスクリーニングする方法が挙げられる。

【0030】

また、アカゲザル ORL1 遺伝子とヒト ORL1 遺伝子との間の相同性は、コーディング領域において約 95.9% であり、44 塩基が相違する。本発明の核酸には、配列番号 1 の 1 又は 2 以上の塩基において置換、欠失、挿入、付加があるものも含まれる。かかる置換、欠失、挿入、付加の塩基数としては、1～43 塩基であることが好ましく、1～30 塩基であることがより好ましく、1～20 塩基であることがさらに好ましく、1～10 塩基であることが特に好ましく、1～5 塩基であることがさらに好ましい。また、このような核酸は、その相同性に基づけば、配列番号 1 の塩基配列との相同性が 96% 以上であることが好ましく、97% 以上であることがより好ましく、98% 以上であることがさらに好ましく、99% 以上であることが特に好ましい。ここで、このような核酸は、本発明に係る配列番号 1 に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することにより得ることができる。また、その核酸の由来となる動物種としては特に限定されないが、具体的には、例えば、サル由来の ORL1 遺伝子であることが好ましく、より具体的には、例えば、アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、リスザル、ミドリザル、アヌビスヒヒ又はコモンマーモセットの ORL1 遺伝子が挙げられる。

【0031】

また、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質は、上述したように、370 アミノ酸からなり、アカゲザル ORL1 とヒト ORL1（配列番号 3）との間の相同性は 97.8% であり、7 アミノ酸が相違する（図 1）。

【0032】

アカゲザル ORL1 の調製方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、単離したアカゲザル ORL1 遺伝子を発現ベクターに導入し、動物細胞、昆虫細胞又は大腸菌等の宿主細胞に導入して組換えタンパク質を発現させた後、精製する方法が挙げられる。

【0033】

本発明は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその変異体を含む。前記変異体としては、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 又は 2 以上であり且つ 6 以下のアミノ酸が置換、欠失、挿入している核酸や、1 又は 2 以上のアミノ酸の付加がある核酸が挙げられる。このような変異タンパク質は、生物学的に活性であることが好ましく、ORL1 としての活性を有することがより好ましい。

【0034】

また、本発明は以下の核酸・遺伝子を含む発現ベクターをも含む。

1. 配列番号 1 に記載の塩基配列を含む単離された核酸。
2. 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる単離された核酸。
3. 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸。
4. 配列番号 1 に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸からなるサル ORL1 遺伝子。

【0035】

ここで、前記発現ベクターとしては、当業者に周知のベクターであれば特に制限はなく、例えば、p cDNA3.1、p BlueBacHis2、p CI-neo、p cDNA I、p MC1neo、p XT1、p SG5、p EF1/V5-HisB、p CR2.1、p ET11、λgt11 又は p CR3.1 が挙げられる。

【0036】

また、前記 1. における「配列番号 1 に記載の塩基配列を含む」とは、前記塩基配列に、ベクターとのリンカー配列や遺伝子組換えに使用可能な制限酵素切断部位等の遺伝子の改変に必要な配列が付加されていることをいう。

【0037】

さらに、本発明は、前記発現ベクターを含む宿主細胞をも含む。

【0038】

当該宿主細胞としては、当業者に周知の細胞であれば特に制限はなく、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれでもよい。かかる細胞としては、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、L-M (TK-)、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。

【0039】

また、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその変異体に対する抗体を含む。当該抗体は、前記タンパク質又はその一部のペプチドを抗原として調製することができ、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよい。当該抗体はエпитープとなるアミノ酸配列によってサルORL1のみならず、異種のORL1にも反応する場合があるが、サルORL1にのみ選択性を有する抗体を調製する場合には、サルと異種のORL1において相同性の低い領域をペプチド抗原として使用してモノクローナル抗体を調製することにより、所望の特異性を有する抗体を調製することができる。

【0040】

次に、本発明にかかる、配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸若しくは配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の用途について列挙し、それぞれ説明する。

【0041】

(1) 化合物の評価

本発明の核酸又はタンパク質を用いて、ORL1に作用する化合物の評価をすることができる。ORL1に対する作用を検出する方法として、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出する方法、被検化合物の接触によって変化した遺伝子の発現量を検出する方法、及び、当該接触によって生じたORL1を介した細胞内情報伝達の活性を検出する方法が挙げられる。以下、順に説明する。

【0042】

まず、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出することにより、被検化合物を評価する方法について説明する。

【0043】

本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該受容体を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該受容体に対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

【0044】

また、本発明の第2の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該受容体を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。

【0045】

被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物が挙げられる。

【0046】

また、サルORL1遺伝子を発現する細胞は、当業者が公知の方法で調製すればよく、具体的な方法としては特に制限はないが、例えば以下の方法によることができる。すなわち、本発明の配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングし、クローニングされた核酸を有するベクターを宿主細胞に導入することにより調製する。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、p cDNA3.1、pBlueBachHis2、pCI-neo、p cDNAI

、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2.1、pET11、λgt11又はpCR3.1が挙げられる。

【0047】

次に、本発明の核酸が導入された発現ベクターを宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるものであれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフエクション法又は遺伝子銃が挙げられる。

【0048】

次に、このようにして調製したORL1を発現する細胞に被検化合物を接触させる。接触させる方法としては特に制限はなく、例えば、水溶液や緩衝液のような溶液中で接触させる方法が挙げられる。

【0049】

細胞表面に発現した受容体と被検化合物との結合は、例えば、結合した化合物に付された標識による検出（例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する）のほか、被検化合物の細胞表面上の前記受容体への結合による細胞内へのシグナル伝達（例えば、Gタンパク質の活性化、Ca²⁺、またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化、受容体のインターナリゼーション）を指標に検出することができる。また、前記シグナル伝達によって生じたシグナル伝達上の分子の発現レベルや活性を指標にすることもできる。ここで、当該発現レベルを指標とする場合、発現レベルの測定法は特に制限されないが、例えば、ノーザンブロッティング、ウェスタンブロッティング又はDNAチップが挙げられる。ここで、本発明における「発現レベル」とは、ORL1を介した情報伝達経路上に存在するタンパク質をコードする遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子にはDNA又はmRNAのいずれもが含まれる。また、発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、ORL1を介した情報伝達経路上に存在するタンパク質の翻訳産物の絶対量又は相対量をいう。また、シグナル伝達上の分子の活性を指標にする場合、活性測定方法は特に制限されず、測定の対象となる分子の種類によって好適な方法を選択すればよい。

【0050】

一方、単離されたサルORL1を化合物の評価に直接使用することもできる。すなわち、被検化合物をサルORL1に接触させ、次に、接触によって生じたORL1の活性の変化を検出する方法である。

【0051】

かかる接触の方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合することにより接触させる方法や、ORL1をメンブレン上に固定し、メンブレン上で被検化合物と接触させる方法が挙げられる。

【0052】

次に、接触によって生じたORL1の活性の変化を検出する。

【0053】

タンパク質の活性測定方法としては、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよく、具体的には、例えば、ORL1に対するノシセプチンの結合活性を指標にする方法が挙げられる。

【0054】

前記のノシセプチンの結合活性を指標にする方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、ORL1が固定されたメンブレンに対する被検化合物の親和性を測定することによって結合活性を測定する方法が挙げられる。ここで用いられる被検化合物は、検出が容易なように放射性同位体等で標識されていてもよい。また、前記結合活性の検出方法

として、放射性同位体で標識したノシセプチンと競合してORL1へ結合する化合物を検出する方法も挙げられ、係る方法を用いた場合には、被検化合物の標識は不要である。

【0055】

以上のように、本発明の化合物の評価方法により化合物を検出した結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性（対照）より低い値を示した場合には、当該被検化合物は、本発明に係るORL1トリガンドとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、前記受容体に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物（アゴニスト）および当該活性を有しない化合物（アンタゴニスト）などが含まれる。アゴニストは、前記受容体に対するノシセプチン及びそのアナログと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、前記受容体に対するノシセプチンおよびそのアナログが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明に係るORL1を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

【0056】

また、本発明の化合物の評価方法により、ORL1への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進又は阻害する物質のスクリーニングを行うことができる。すなわち、上述した方法によって複数の被検化合物を評価することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する化合物を選択することができる。かかる選択の結果、被検化合物非存在下においてノシセプチン及びそのアナログを作用させた場合の細胞内シグナル伝達の変化と比較して、その変化が抑制されれば、当該被検化合物は、本発明に係るORL1への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が細胞内シグナル伝達を増強させれば、当該化合物は、本発明に係るORL1への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進する化合物であると判定される。このようなスクリーニング方法によって選択された化合物は、ノシセプチン及びORL1が関与する各種疾患に対する医薬、例えば癌性疼痛、術後疼痛、偏頭痛、痛風、慢性リウマチ、慢性疼痛、神経痛等の痛みを伴う疾患に対する鎮痛薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬、耐性克服薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬依存性克服薬、鎮痛作用増強薬、抗肥満薬、脳機能改善薬、アルツハイマー病治療薬、抗痴呆薬、精神分裂症治療薬、パーキンソン病及び舞踏病に代表される退行性神経変性疾患治療薬、抗うつ薬、尿崩症治療薬、多尿症治療薬又は低血圧治療薬として有用であると考えられる。

【0057】

また、上述した本発明の化合物の評価方法により、PET (positron emission tomography) に用いるリガンドの評価を行うことができる。PETは、水、酸素、ブドウ糖、アミノ酸といった生体内に存在する物質あるいは目的とする受容体に対するリガンドを放射線標識して体内に投与することにより、非侵襲的に生体機能を観察する方法であり、研究や臨床において利用されている。PETの特徴は、トレーサーとして用いるリガンドに依存した機能特異的なイメージングを可能にする点にあり、新たなトレーサーの開発は未知の生体機能の解明や疾患の診断に不可欠である。本発明の化合物の評価方法によれば、被検化合物としてPETリガンド候補物質を適用することにより、当該物質のインビトロでの評価を行うことが可能となる。

【0058】

(2) ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の配列番号1に記載の塩基配列の一部、又は全部からなる核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用することにより、ORL1遺伝子を検出することが可能である。かかる検出としては、生体由来の組織や細胞を被検体としたORL1遺伝子の検出のみならず、ORL1遺伝子又は当該遺伝子と相同性の高い遺伝子のクローニング等にも応用可能である。また、前記核酸をプローブとして使用し、種々の組織における遺伝子発現を調べることにより、遺伝子発現の分布を同定することも可能である。

【0059】

前記核酸をプローブとして使用する場合、ハイブリダイゼーションの方法としては特に

制限はなく、例えば、サザンハイブリダイゼーション、ノザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、Fluorescence in situ hybridization (FISH)、in situ hybridization (ISH)、DNAチップ法が挙げられる。

【0060】

前記核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用する場合、少なくとも連続する20塩基の長さの核酸が必要であり、好ましくは40塩基、さらに好ましくは60塩基、特に好ましくは80塩基以上のものが使用される。また、当該プローブは、必要に応じて検出可能なように標識して用いてもよい。具体的には、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等の放射性同位体で標識されていてもよく、ビオチン、蛍光色素、酵素、金コロイド等で標識されていてもよい。

【0061】

また、前記核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用する場合のハイブリダイゼーションの条件としては、プローブの長さやハイブリダイゼーションの対象となる遺伝子の種類に応じて当業者が適宜選択すればよいが、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9.47-9.62及び11.45-11.61を参照して行うことができる。より具体的には、約45℃にて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃にて2.0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジェンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2×SSC、50℃まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。

【0062】

(3) PCRに使用するプライマー

ORL1遺伝子を検出する方法として、本発明の配列番号1に記載の塩基配列の一部をプライマーとして使用したPolymerase Chain Reaction (PCR)法を挙げることができる。

【0063】

このようなプライマーの長さは、その塩基配列や単離する遺伝子の塩基配列等によって適宜設定することができるが、一般に、連続した10～60塩基であることが好ましく、15～30塩基であることがより好ましい。

【実施例】

【0064】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0065】

実施例1

(アカゲザルORL1 cDNAの単離)

全RNAはISOGEN (日本ジーン社製)を用いてアカゲザル前頭前野皮質から調製した。オリゴdTプライマー及びAMVトランスクリプターゼ (ライフサイエンス社製)を用いて、全RNAから1ストランドcDNAを合成した。ヒトORL1の5'及び3'非翻訳領域に設定したプライマー (5'-TACCGTACAGAGTGGATTTC (配列番号3)、3'-ACGGGTACCACGGACAG (配列番号4))を用いて、アカゲザル前頭前野皮質cDNAから全長のORL1を増幅した。遺伝子の増幅にはTaKaRa ExTaq (宝酒造社製)を用い、94度で45秒、50度で72秒、72度で90秒を30サイクルの条件で行った。この条件により増幅された1.2kbの核酸断片を単離し、Eukaryotic TACloning Kit (インビトロゲン社製)を用いて発現ベクターpCR3.1にサブクローニングした。アカゲザルORL1の種々の箇所に設定したプライマーを用いてシーケンサーにより両鎖の塩基配列を決定した。塩基配列の確認は複数のクローンの

塩基配列をシーケンスすることにより行った。

【0066】

実施例2

(アカゲザルORL1安定発現細胞の構築)

アカゲザルORL1全長を含む発現ベクターをTransfectam Reagent (プロメガ社製)を用いてCHO (Chinese Hamster Ovary) - K1細胞にトランスフェクトした。この細胞は10%牛胎児血清及び1mg/ml ジェネティシン (ギブコ社製)を含むHam' s F12培地を用い、37度、5%CO₂存在下で培養した。ジェネティシン抵抗性を示した細胞をクローニングし、^[125I][Tyr¹⁴]ノシセプチンを用いたバインディングアッセイによりORL1を発現しているクローン (CHO-rhORL1) を同定した。

【0067】

実施例3及び比較例1

(メンブレンの調製)

まず、CHO-rhORL1細胞を、154mM NaCl、10mM KCl、0.8mM CaCl₂及び20%スクロースを含む10mM 3-(N-morpholino) propa sulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH7.4) 中でホモジナイズした。ホモジナイズした溶液を10,000gで遠心分離した後、上清を100,000gで遠心分離した。得られた沈殿物を5mM HEPES/Tris (pH7.4) 中でホモジナイズした。タンパク質濃度は、BCAプロテインアッセイキット (シグマ社製) により、BSAを対照として測定した。

(ラジオリガンド結合実験)

メンブレンを、種々の濃度 (10~320pM) の^[125I][Tyr¹⁴]ノシセプチン、50mM HEPES、10mM NaCl、1mM MgCl₂、2.5mM CaCl₂、0.1% bovine serum albumin (BSA) 及び0.025% bacitracineを含む総量200マイクロリットルの溶液と、pH7.4、37度、60分の条件下でインキュベートした。また、メンブレンを1マイクロモル/リットルの非標識のノシセプチン存在下でインキュベートした後に残存する放射活性の総量を非特異的結合とみなし、測定値から非特異的結合値を引いた数値を特異的結合値とした。インキュベーションは、セルハーベスターを用いて、0.5% ポリエチレンイミン (polyethyleneimine) 中で予浸したGF/Cフィルターを急速に通過させることにより停止させた。その後、フィルターは4度の5mM HEPES/Tris、0.1% BSA (pH7.4) で3回洗浄した。フィルター上に残った放射活性はガンマカウンター (パッカード社製) により測定した。また、得られた結果はプリズムソフトウェアパッケージ (Graphpad社製) により解析した。

【0068】

また、アカゲザルORL1遺伝子に代えてヒトORL1遺伝子を用いた以外は実施例3と同様にして解析を行った (比較例1)。

【0069】

図2 (A) 及び (B) から算出されるアカゲザルORL1に対する^[125I][Tyr¹⁴]ノシセプチンの解離定数 (kd) は27プラスマイナス4pMであり、ノシセプチンがサルORL1に対してもヒトと同様に高い親和性を有することが明らかとなった。

【0070】

実施例4及び比較例2

(^[35S]GTPγS結合実験)

実施例3において調製したメンブレンを、20mM HEPES、100mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA及び5μM GDP、pH7.4の溶液中の200pM ^[35S]GTPγSとインキュベートした。この溶液にはコムギ胚芽アグルチニン (wheat germ agglutinin) でコートされたSPAビーズを加えてあり、種々の濃度のノシセプチン存在下又は非存在下、2.5時間、25度でイ

ンキュベートした。また、メンブレンを非標識の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (10 マイクロモル/リットル) 存在下でインキュベートした後に残存する放射活性の総量を非特異的結合とみなし、測定値から非特異的結合値を引いた数値を特異的結合値とした。メンブレンに結合した放射活性は、トップカウントマイクロプレートシンチレーションカウンター (Top Count microplate scintillation counter) (パッカード社製) により検出した。

【0071】

また、アカゲザル ORL1 遺伝子に代えてヒト ORL1 遺伝子を用いた以外は実施例 4 と同様にして解析を行った (比較例 2)

図 3 のノシセプチンの用量反応曲線より算出される EC_{50} はアカゲザル ORL1 が 2.3 プラスマイナス 0.4 nM であり、ノシセプチンに対してヒト ORL1 と同様な機能を有していると判断できた。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明の核酸、タンパク質及び化合物の評価方法によれば、ヒト以外の霊長類の ORL1 遺伝子及びタンパク質を得ることが可能となるとともに、当該遺伝子又はタンパク質を用いて化合物の評価、スクリーニングを行うことが可能となる。従って、当該遺伝子又はタンパク質を用いた治療薬や診断薬の評価、開発が可能となる。従って、ヒトの医薬の研究、開発の効率化に大きく貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図 1】 ヒト及びアカゲザルの ORL1 のアミノ酸配列の相同性を比較した図である。

【図 2】 (A) は、アカゲザル ORL1 を用いた結合実験において、 $[\text{I}^{125}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセプチンの濃度と ORL1 への特異的結合量との関係を示す図である。

【0074】

(B) は、ヒト ORL1 を用いた結合実験において、 $[\text{I}^{125}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセプチンの濃度と ORL1 への特異的結合量との関係を示す図である。

【図 3】 アカゲザル又はヒト ORL1 を用いた結合実験において、ノシセプチンの濃度と $[\text{S}^{35}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の ORL1 への特異的結合量の関係を示す図である。

【配列表】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> rhesus monkey ORL1 receptor and evaluation method of a compound

<130> 0334

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1113

<212> DNA

<213> rhesus monkey

<400> 1

```
atggagcctc tcttccccgc cccattctgg gaggttatct acggcagcca ccttcagggc      60
aacctgtccc tcctcagtcc caaccacagt ctgctgcctc cgcatctgct gctcaatgcc      120
agtcacagcg ccttcctgcc cctcgggctc aaggtcacca tcgtggggct ctacctggcc      180
gtgtgtgtcg gggggctcct ggggaactgc ctgctcatgt acgtcatcct caggcacacc      240
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggcaga cactctggtc      300
ctgctgacgc tgcccttcca gggcacagac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat      360
gccctgtgca agacagtcac tgccattgac tactacaaca tgttcaccag caccttcacc      420
ctgactgcca tgagtgtgga tcgctacgta gccatctgcc acccatccg cgccctcgac      480
gtccgcacat ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct ggcctctgtt      540
gttgggtgtc ctgttgccat catgggctcg gcacaggctg aggatgaaga gatcgagtgc      600
ctgggtggaga tccctgcccc acaggactac tggggccctg tgtttgccgt ctgcatcttc      660
ctcttctcct tcatcgtccc cgtgctcatc atctccgtct gctacagcct catgatccgg      720
aggctccgcg gagtccgcct gctctcgggc tcccgggaga aggaccggaa cctgcggcgc      780
atcactcggc tgggtgctggt ggtggtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag      840
gtctttgtgc tggccaagg gctgggagtg cagccaggca gcgagactgc cgtggccatt      900
```

ctgcgtttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctatgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcctc tgccctgcgc 1020
cgggaggtgc aggtgtccga ccgtgtgcgc agcattgcca aagatgtggc cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcggcccgcg tga 1113

<210> 2
<211> 370
<212> PRT
<213> rhesus monkey

<400> 2

Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
1 5 10 15

His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
20 25 30

Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Ser Ala Phe Leu Pro Leu
35 40 45

Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
50 55 60

Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met Tyr Val Ile Leu Arg His Thr
65 70 75 80

Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
85 90 95

Asp Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu
100 105 110

Leu Gly Phe Trp Pro Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala
115 120 125

Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met
130 135 140

Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Arg Thr Ser Ser Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala
165 170 175

Leu Ala Ser Val Val Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln
180 185 190

Val Glu Asp Glu Glu Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Ala Pro Gln
195 200 205

Asp Tyr Trp Gly Pro Val Phe Ala Val Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe
210 215 220

Ile Val Pro Val Leu Ile Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg
225 230 235 240

Arg Leu Arg Gly Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg
245 250 255

Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
260 265 270

Val Gly Cys Trp Thr Pro Val Gln Val Phe Val Leu Val Gln Gly Leu
275 280 285

Gly Val Gln Pro Gly Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys
290 295 300

Thr Ala Leu Gly Tyr Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala
305 310 315 320

Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala
325 330 335

Ser Ala Leu Arg Arg Glu Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile
340 345 350

Ala Lys Asp Val Ala Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg
355 360 365

Pro Ala
370

<210> 3
<211> 370
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
1 5 10 15

His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
20 25 30

Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
35 40 45

Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
50 55 60

Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met Tyr Val Ile Leu Arg His Thr
65 70 75 80

Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
85 90 95

Asp Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu
100 105 110

Leu Gly Phe Trp Pro Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala
115 120 125

Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met
130 135 140

Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Arg Thr Ser Ser Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala
165 170 175

Leu Ala Ser Val Val Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln
180 185 190

Val Glu Asp Glu Glu Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Thr Pro Gln
195 200 205

Asp Tyr Trp Gly Pro Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe
210 215 220

Ile Val Pro Val Leu Val Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg
225 230 235 240

Arg Leu Arg Gly Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg
245 250 255

Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
260 265 270

Val Gly Cys Trp Thr Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu
275 280 285

Gly Val Gln Pro Ser Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys
290 295 300

Thr Ala Leu Gly Tyr Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala
305 310 315 320

Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala

325

330

335

Ser Ala Leu Arg Arg Asp Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile
 340 345 350

Ala Lys Asp Val Ala Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg
 355 360 365

Pro Ala
 370

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide

<400> 4
 taccgtacag agtggatttg c

21

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide

<400> 5
 acgggtacca cggacag

17

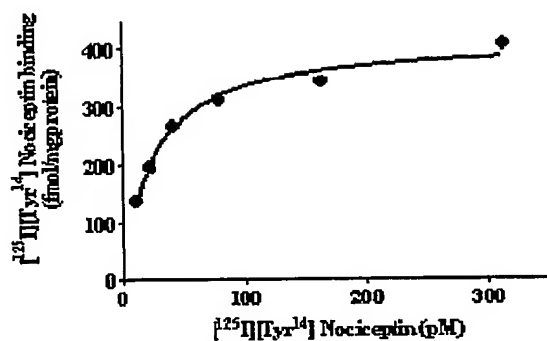
【書類名】 図面

【図 1】

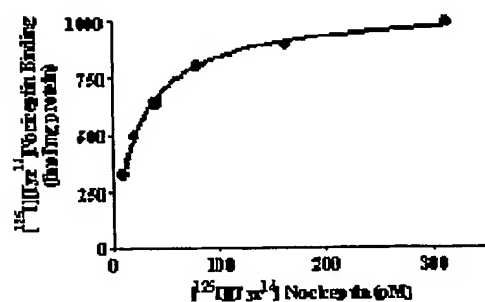
	10	20	30	40	50
theater	1	1	1	1	1
theater	1	1	1	1	1
	60	70	80	90	100
theater	51	51	51	51	51
theater	51	51	51	51	51
	110	120	130	140	150
theater	101	101	101	101	101
theater	101	101	101	101	101
	160	170	180	190	200
theater	151	151	151	151	151
theater	151	151	151	151	151
	210	220	230	240	250
theater	201	201	201	201	201
theater	201	201	201	201	201
	260	270	280	290	300
theater	251	251	251	251	251
theater	251	251	251	251	251
	310	320	330	340	350
theater	301	301	301	301	301
theater	301	301	301	301	301
	360	370	380	390	400
theater	351	351	351	351	351
theater	351	351	351	351	351

【図 2】

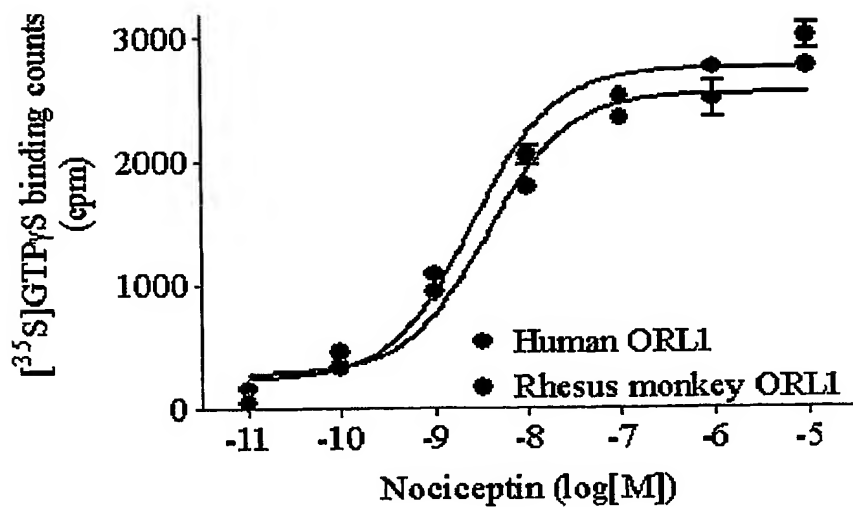
(A)



(B)



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ヒト以外の霊長類の O R L 1 遺伝子及びタンパク質を提供することを目的とする。また、当該遺伝子又はタンパク質を用いた化合物の評価方法を提供することを目的とする。

【解決手段】

配列番号 1 の塩基配列を有する核酸又は配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、前記核酸を含む発現ベクター又は当該ベクターを含む宿主細胞によりヒト以外の霊長類の O R L 1 遺伝子等が提供され、また、O R L 1 に作用する化合物の評価、スクリーニング等が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 7 7 0 0 6
受付番号	5 0 3 0 1 8 3 7 9 8 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 1 1 月 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年11月 6日

特願 2 0 0 3 - 3 7 7 0 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 0 7 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町 2 丁目 2 番 3 号

氏 名

萬有製薬株式会社